

특 허 법 원

제 2 부

판 결

사 건 2021허1424 등록무효(특)

원 고 1. A

2. B

원고들 소송대리인 특허법인 아이퍼스

담당변리사 권구성

피 고 C 산학협력단

대표자 단장 D

소송대리인 특허법인 다나

담당변리사 김기정

변 론 종 결 2021. 10. 27.

판 결 선 고 2021. 12. 3.

주 문

1. 원고들의 청구를 모두 기각한다.
2. 소송비용은 원고들이 부담한다.

## 청 구 취 지

특허심판원이 2020. 12. 24. 2019당2371호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

## 이 유

### 1. 기초 사실

#### 가. 이 사건 특허발명(갑 제3호증)

- 1) 발명의 명칭: 바이오핀<sup>1)</sup>
- 2) 특허권자: 피고
- 3) 출원일/ 등록일/ 등록번호: 2011. 3. 15./ 2013. 8. 21./ 제10-1300666호
- 4) 청구범위

【청구항 1】 세포막 단백질; 및 상기 단백질의 양 말단에 결합된 2 이상의 세포 침투 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)를 포함하는 융합 단백질.

【청구항 2】 내지 【청구항 19】 (기재 생략)

#### 5) 주요 내용

별지 기재와 같다.

#### 나. 당사자의 지위 등

---

1) 본 명세서에서 "바이오핀, biopin"은 생물학적 물질, 예를 들어, 세포를 고정하기 위한 융합 단백질을 말한다. 특히, 상기 바이오핀에 사용되는 두 가지 요소는 포유동물 세포의 특정 막단백질과 세포 침투 펩타이드로 이루어져 있고, 세포의 특정 막단백질이 머리부분을, 상기 막단백질의 양 말단에 결합된 세포 침투 펩타이드는 각각 끝부분을 형성하는 핀 구조를 이루는 것이다(명세서 [0034]).

원고들은 피고 C 산학협력단(이하 '피고 대학'이라 한다)의 지도 교수인 소외 E의 연구실에 2005년(원고 B) 및 2006년(원고 A)에 합류하였는데, 이 사건 특허발명의 출원을 전후하여 위 연구실에서 박사과정에 있었다. 피고 대학은 E과 F로부터 이 사건 특허발명의 특허를 받을 수 있는 권리를 양도받아 이에 대하여 특허등록을 받았다.

#### 다. 이 사건 심결의 경위

1) 원고들은 2019. 7. 23. 피고를 상대로 특허심판원에 "원고들은 이 사건 특허발명의 공동 발명자에 해당하여 원고들이 발명자에서 배제되어 등록된 이 사건 특허발명은 특허법 제33조 제1항 본문 및 동법 제44조를 위반한 경우에 해당하므로, 동법 제133조 제1항 제2호의 무효사유를 갖는다."라고 주장하면서 이 사건 특허발명에 대한 등록무효심판을 청구하였다.

2) 이에 특허심판원은 이를 2019당2371호로 심리하여 2020. 12. 24. "원고들이 이 사건 특허발명의 제조 및 실험에 일부 기초 실험에 참여한 것은 인정되나, 이는 실험을 단순 보조한 수준에 불과하여 이 사건 특허발명의 진정한 발명자로 볼 수 없으므로 이 사건 특허발명은 특허법 제44조를 위반하였다 할 수 없다."라는 이유로 원고들의 심판청구를 기각하는 심결을 하였다(이하 '이 사건 심결'이라 한다).

【인정 근거】 다툼 없는 사실, 갑 제1, 2, 3호증의 각 기재, 변론 전체의 취지

## 2. 당사자의 주장 요지

### 가. 원고들

원고들은 이 사건 특허발명을 구상하고 그것을 구체화하기 위한 실험 및 결과를 도출하는데 참여한 발명자임에도, 피고는 원고들의 동의 없이 소외 E, F 2인만의 동의를 얻어 특허를 받을 수 있는 권리를 양도받아 이 사건 특허발명을 출원하여 등록받았다. 따라서

이 사건 특허발명은 피고가 공유자 전원의 동의를 얻지 않은 채 지분을 양도받아 출원한 후 등록된 것으로서 무효사유가 있음에도 이와 달리 판단한 이 사건 심결은 위법하다.

#### 나. 피고

원고들은 소외 E의 지시에 따라 이 사건 특허발명의 일부 실험에 참가한 것에 불과할 뿐 이 사건 특허발명의 공동 발명자가 아니므로 이 사건 특허발명에는 원고들 주장과 같은 무효사유가 존재하지 않는다.

### 3. 이 사건 심결의 위법 여부

#### 가. 관련 법리

2인 이상이 공동으로 발명을 한 때에는 특허를 받을 수 있는 권리를 공유하고, 그 경우 공유자 전원이 공동으로 특허출원을 하여야 하며, 특허를 받을 수 있는 권리가 공유인 경우에는 각 공유자는 다른 공유자 모두의 동의를 받아야만 그 지분을 양도할 수 있다(특허법 제33조 제2항, 제37조 제3항, 제44조)<sup>2)</sup>. 이와 같은 규정에 반하여 등록된 특허는 무효이고, 이러한 등록무효 사유의 입증책임은 그 무효를 주장하는 자에게 있다.

한편, 특허법상 발명자(공동발명자를 포함한다)에 해당한다고 하기 위해서는 단순히 발명에 대한 기본적인 과제와 아이디어만을 제공하였거나 연구자를 일반적으로 관리하고 연구자의 지시로 데이터의 정리와 실험만을 한 경우 또는 자금·설비 등을 제공하여 발명의 완성을 후원·위탁하였을 뿐인 정도 등에 그치지 않고, 발명의 기술적 과제를 해결하기 위한 구체적인 착상을 새롭게 제시·부가·보완하거나, 실험 등을 통하여 새로운 착상을 구체화하거나, 발명의 목적 및 효과를 달성하기 위한 구체적인 수단과

---

2) 이 사건 특허발명의 출원, 등록 이후 위 규정들에 대한 개정은 있었으나 실질적인 내용은 동일하다.

방법의 제공 또는 구체적인 조언·지도를 통하여 발명을 가능하게 한 경우 등과 같이 기술적 사상의 창작행위에 실질적으로 기여하기에 이르러야 한다(대법원 2012. 12. 27. 선고 2011다67705, 67712 판결, 대법원 2011. 7. 28. 선고 2009다75178 판결 등 참조).

#### 나. 원고들을 이 사건 특허발명의 공동발명자로 인정할 수 있는지 여부

이 사건 특허발명에 대하여 등록무효 사유가 있는지와 관련하여 쟁점은, 원고들이 이 사건 특허발명의 공동발명자로 인정할 수 있는지 여부이므로 이에 관하여 본다.

1) 갑 제4, 5, 7호증(변론 전체의 취지에 의해 진정성립 인정), 갑 제8 내지 11, 13 내지 22호증, 을 제1호증의 각 기재에 변론 전체의 취지를 종합하면 아래 각 사실이 인정된다.

① E은 2008. 10. 자신의 실험노트에 '막단백질과 PTD<sup>3)</sup> 또는 TAT<sup>4)</sup>를 융합시키고, 막단백질은 세포사멸을 일으키지 않아야 한다'는 이 사건 특허발명이 기초하고 있는 기술사상에 관한 메모를 하였고(을 제1호증, 노트 63쪽), 그 이후 원고 A은 2010. 1. 18.부터 2020. 6. 16.까지 E의 지시를 받아 미국 소재 외부 업체(Bio-Synthesis Inc.)로부터 OPRD(opioid receptor delta transmembrane domain)<sup>5)</sup> 연구에 사용할 펩타이드를 구입하였다.

② E은 2010. 10. 8. 소외 G 박사와 원고 A에게 "향후 연구 계획"이라는 제목의 메일을 보냈는데, 그 메일에는 "OPRD의 계획은 아래와 같아요...(중략)... 의견 주세요"

3) 세포 침투 펩타이드(cell-penetrating peptide(CPP)) 또는 단백질 전달체(Protein Transduction Domain(PTD))는 이들과 화학적, 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결된 특정 단백질, 바이러스, DNA, RNA, 지방, 탄수화물 또는 화학적 화합물을 진핵 또는 원핵 세포의 세포질 또는 핵내로 전달가능한 물질 펩타이드를 말한다(이 사건 특허발명 명세서, [0036]).

4) 인간 면역결핍 바이러스 타입 I(HIV-1)에서 유래한 trans-activating transcriptional activator(Tat) 단백질에 해당한다.

5) 세포막 단백질로서, 세포의 세포막에 걸려 세포막에 고정되는 특성을 가진다.

라는 내용과 함께 원고 A에게 이 사건 특허발명이 기초로 하는 OPRD 연구에 더 집중 하길 바란다는 취지의 요청을 하였다.

③ 원고 A은 2010. 12. 29. 세포막 단백질과 단백질의 양 말단에 결합된 2 이상의 세포 침투 펩타이드(CPP)로 구성되는 융합 단백질에 의한, 붉은색으로 염색된 실험용 쥐의 심장 근아세포(Rat cardiac myoblast H9c2 세포)와 녹색 형광 염료로 염색된 랫트의 중간엽 줄기세포(ratmesenchymal stem cells, MSCs)에서의 세포간 결합 증가 효과에 관한 실험 결과가 기재된 문서를 작성하였다.

④ 원고 A은 2011. 1. 18.부터 2011. 1. 19.까지 E과 펩타이드의 추가 구매 주문과 관련하여 이메일을 통해 연락을 주고 받았고(갑 제10호증), 2011. 1. 19. E으로부터 '1차적으로 OPRD를 중심으로 양쪽에 PTD를 위치시키는 것' 등 이 사건 특허발명의 융합 단백질에 관한 아이디어를 언급하는 내용이 담긴 이메일(수신인: G, 참조인: 원고 A)을 수신하였다. 이후 원고 A은 2011. 1.부터 2011. 8.까지 외부 업체(Bio-Synthesis Inc.)로부터 펩타이드를 추가 구입하였다.

⑤ 원고들은 E으로부터, 2011. 2. 15. 'BPin Project'라는 제목으로 이 사건 특허발명의 명세서에 도시된 도면을 요청하는 내용의 이메일을 받았고, 2011. 2. 22. 이 사건 특허발명과 관련한 연구 내용을 요약하는 내용의 PPT를 작성해달라는 취지의 이메일을 받았다.

⑥ 원고들은 2011. 11.부터 2013. 4.까지, C 의과대학 이미징센터의 공초점 현미경(Confocal Microscopy, Carl Zeiss L700, L710)의 사용승인을 신청하여 이를 사용하였다.

2) 그러나 앞서 든 증거들 및 변론 전체의 취지를 종합하여 인정되는 다음과 같은

사정에 비추어 보면, 위 인정사실만으로는 원고들이 이 사건 특허발명의 공동발명자에 해당한다고 보기 어렵고, 달리 이를 인정할 증거가 없다.

① 이 사건 특허발명의 기술사상은 막단백질과 pin의 역할을 하는 PTD 내지 펩타이드를 융합함으로써 세포간의 고정을 이끌어 내어 실제 임상에서 줄기세포의 소실율을 감소시키는 것으로, 여기에서 OPRD라는 오피오이드 수용체가 그 막단백질로서 세포의 사멸을 일으키지 않아, 세포 내지 조직의 보호에 효과적이라는 것이다. 그런데 이러한 기술사상은 2008. 10. E에 의해 최초로 착상되었고(이에 대해서는 원고들도 자인하고 있다), 원고들은 PTD 또는 CPP와 OPRD가 결합된 구조는 원고들에 의해 도출되었다고 주장하나 위 구조의 도출이 원고들에 의해 착상 내지 제안되었다고 인정할 아무런 증거가 없다.

② 원고들은 이 사건 특허발명 관련 연구를 진행하는 과정에서 형광과장이 겹쳐 실험결과를 제대로 하기 어려운 난관이 있었고 이를 극복하기 위해 공초점 현미경 판매 회사(Carl Zeiss)에 기술자문을 요청하여 설정을 변경하였다고 주장하나, 설사 그러한 사실이 인정된다고 하더라도 이는 단지 앞서 E이 제시한 착상을 실험으로 구체화하기 위한 과정에서 발생하는 실험상의 단순 문제점을 해결한 것에 불과하고, 이를 들어 원고들이 바이오핀 융합 단백질/ 펩타이드의 설계 등을 하여 '이 사건 특허발명의 기술적 과제를 해결하기 위한 구체적인 착상' 및 '발명의 목적 및 효과를 달성하기 위한 구체적인 수단과 방법의 제공 또는 구체적인 조언·지도'를 하였다고 볼 수는 없다.

③ 갑 제4호증 제1면에는 심장 근아세포(Rat cardiac myoblast H9c2 세포)에 OPRD 펩타이드를 처리하고, 이렇게 처리된 세포를 일정한 시간(1, 2, 4hr) 배양(incubation)한 후에 공초점 현미경으로 확인하는 내용의 실험이 기재되어 있고, 갑 제

4호증의 제2면에는 OPRD 펩타이드(OP44 및 OP55)를 다른 조건에서 H9c2세포에 처리한 후 형광 현미경으로 확인하는 실험의 내용이 기재되어 있으며, 그 실험결과 사진이 이 사건 특허발명의 명세서에 포함되어 있다. 그러나 갑 제4, 5호증의 각 기재만으로는 위와 같은 실험이 E의 지시에 의한 것이 아니라 원고들에 의해 독자적으로 수행된 것이고, 나아가 그 실험에 의해 원고들이 이 사건 특허발명에 관한 새로운 착상을 구체화하거나 발명의 목적 및 효과를 달성하기 위한 구체적인 수단과 방법을 제공하였다고 단정할 수 없다.

④ 앞서 본 바와 같이 E이 이 사건 특허발명과 관련된 새로운 아이디어를 착상하고 G 및 원고들에게 이메일을 통해 OPRD 펩타이드를 이용한 실험방법 및 그에 따른 실험결과의 정리를 지시한 바 있고, 특히 E은 자신이 착상한 바이오핀 펩타이드 합성을 외부에 의뢰하는 과정에서 원고 A에게 펩타이드의 구체적인 서열정보까지 명확히 제시하고 있는 등 실험 전반을 계획하고 구체적인 실험 방향을 지시하였다. 따라서 비록 위 실험의 세부적인 사항이 원고들에 의해 수행된 것이고 그 과정에서 원고들이 특수 실험기기인 공초점 현미경을 사용하기 위해 이미징 센터의 실험기기 사용을 예약하여 이를 사용하였고, 그 실험결과(raw data)를 원고들이 보관하고 있다고 하더라도, 그러한 사실만으로는 원고들이 이 사건 특허발명의 기술적 과제를 해결하기 위한 구체적인 착상을 하였다거나 발명의 목적 및 효과를 달성하기 위한 구체적인 수단과 방법을 제공하였다고 인정하기 어렵다.

⑤ 반면 이 사건 특허발명 과정에서 작성된 실험노트(을 제1호증)에는 정지영이 막단백질로서의 OPRD의 선택부터 펩타이드(OP-44, OP-55) 합성 또는 재조합 단백질(OP-65, OP-76)의 제조에 필요한 서열 디자인 등 바이오핀의 구조를 설계한 과정과



그에 관한 구체적인 내용이 기재되어 있을 뿐, 원고들이 그러한 바이오핀 구조의 설계나 관련된 착상에 관여하였거나 실험 과정에서 난관에 봉착하여 그 해결책을 제시하거나 실험조건을 변경하는 등의 방법으로 적극적으로 이 사건 발명의 목적 및 효과를 달성하기 위한 구체적인 수단과 방법을 제공하였음을 인정할 아무런 기재가 없다(원고들은 위 연구노트 이외에 원고들이 이 사건 특허발명의 창작행위에 기여한 내용이 기재되어 있는 연구노트가 추가로 작성된 바 있다고 주장하나, 그와 같은 다른 연구노트의 존재나 기재 내용을 알 수 있는 자료는 없다).

#### **다. 소결**

따라서 원고들이 이 사건 특허발명의 공동 발명자에 해당한다고 보기 어려운 이상, 이 사건 특허발명에는 원고들 주장과 같은 등록무효 사유가 인정되지 아니하므로 이와 결론을 같이 한 이 사건 심결은 적법하다.

#### **4. 결론**

그렇다면 이 사건 심결의 취소를 구하는 원고들의 청구는 모두 이유 없으므로 이를 기각하기로 하여 주문과 같이 판결한다.

재판장      판사      김상우

                 판사      이혜진

                 판사      김영기

이 사건 특허발명의 주요 내용

① 기술분야

[0001] 본 발명은 세포막 단백질과 세포 침투 펩타이드로 이루어진 융합 단백질로서, 세포 전달 및 치료, 세포의 추적, 특정 조직 및 세포의 표적화, 분자 영상 시스템, 스텐트 등의 의료 도구에 대해 응용이 가능한 펩타이드성 바이오핀에 관한 것이다.

② 배경기술

[0002] 줄기세포 (stem cells) 등의 다양한 세포전달에 의한 세포치료 기술은 재생의학 기술이 필요한 심장혈관 및 뇌 질환 등의 질환에 주요한 치료 방법으로 대두되고 있다 (Hansson et al., 2009, Cell Stem Cell, 5, 364-377; Koch et al., 2009, Lancet Neurol., 8, 819-829). 실제 임상 적용 측면에서 중간엽 줄기세포(mesenchymalstem cells, MSCs), 혈관전구세포(endothelial progenitor cells, EPCs)와 같은 성체 줄기세포(adult stem cells)는 생체 내에서 분리, 확보하기 쉽고 특정 세포로의 분화 능력도 갖추고 있어 실용화 가능성이 높은 것으로 판단된다(Corselli et al., 2010, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30, 1104-1109; Kumar and Caplice, 2010, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 30, 1080-1087). 특히 손상을 입으면 재생이 어려운 장기인 뇌 및 심장의 주요 질환인 심근경색, 뇌졸중에 대한 다양한 세포치료 임상시험과 함께 긍정적인 결과를 보이고 있다(Williams and Keating, 2008, Gerontology, 54, 300-311). 그러나 현재까지 세포치료 기술의 한계 중 하나인 것은 전달된 세포 (donor cells)가 대상 장기, 조직에 대한 부착률(attachment)이 3~5%에 지나지 않고, 전달 세포가 장기간 남아 있지 않아 장기적인 치료효과가 미미한 단점을 갖고 있다 (Pittenger and Martin, 2004, Circ Res., 95, 9-20; Ryzhov et al., 2008, Circ Res., 102, 356-363). 이에 따라 전달하고자 하는 세포에 다양한 유전자를 전달하여 치료효과를 증진시키고자 하는 연구가 함께 진행되고 있으나(Sheyn et al., 2010, Adv Drug Deliv Rev., 62, 683-698) 유전자 전달 벡터의 안전성, 유전자 전달 시간 등의 고려가 있어야 하고, 특히 유전자 과발현(overexpression)된 세포는 유전적으로 변형된 세포(genetically modified cells)로 향후 세포 치료 임상 적용시 규제 대상이 될 가능성이 높아 이를 적용한 세포치료제 개발은 현실화되기 어렵다.

### ③ 발명의 내용

[0003] 본 발명의 목적은 세포간 접착의 증가를 유도하는 생체 연결용 펩타이드성 바이오핀, 이의 제조방법과 세포전달, 세포치료, 진단 및 치료 시스템 등의 나노 바이오 소재로서의 용도를 제공하는 것이다.

[0004] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0005] 세포막 단백질; 및

[0006] 상기 단백질에 결합된 2 이상의 세포 침투 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0026] 본 발명의 융합 단백질은 세포에 효과적으로 전달되고 세포간 결합을 증가시키는 바이오핀(biopin)으로서, 약물 또는 세포전달, 세포치료, 분자영상, 의료도구 등에 응용 가능함으로써 진단이나 치료를 목적으로 하는 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

### ④ 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0029] 본 발명은 세포내에서 생물학적인 변화를 예측하기 어렵고 부작용 우려가 있는 특정 유전자를 세포내로 전달하여 과발현 시키는 방법이 아닌 단순한 세포간 물리적 결합을 증가시킬 수 있는 바이오핀(Biopin)을 개발하고자 하였다.

[0030] **일반적으로, 세포전달 및 세포치료 기술에서 전달 세포가 대상 장기, 조직에 대해 초기에 얼마나 효과적으로 부착되느냐에 따라 치료 효과가 달라질 수 있다.** 특정 유전자의 과발현 방법 또는 고분자 화합물을 이용해 전달세포를 효율적으로 대상 조직에 전달하려는 다양한 시도는 이에 대한 반증이다. 따라서 종래의 유전자 조작 방법 혹은 고분자를 이용한 세포 전달 기술과 달리 **전달 세포에 펩타이드성 핀을 꽂아 전달하려는 바이오핀의 개발은 세포전달 및 세포치료와 이를 응용한 나노 바이오 분야의 소재로서의 가능성을 제시한다고 하겠다.**

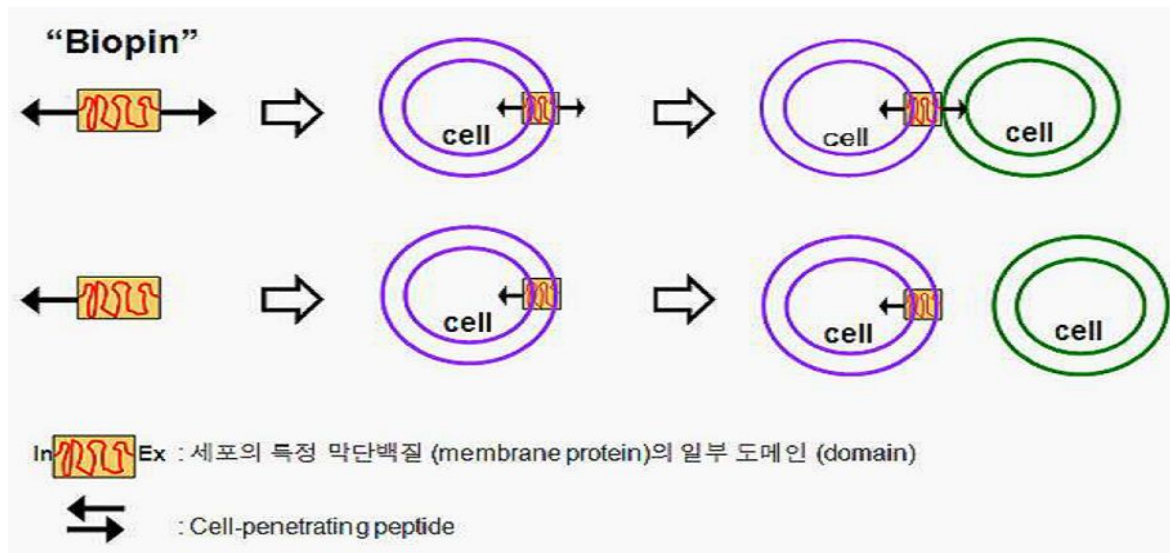
[0031] 따라서, 본 발명은 세포막 단백질; 및

[0032] 상기 단백질에 결합된 2 이상의 세포 침투 펩타이드(cell-penetrating peptide, CPP)를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0033] 상기 융합 단백질은 세포막 단백질의 일 부분에 2 이상의 세포 침투 펩타이드가 결합한 구조를 가지며, 보다 구체적으로 상기 세포 침투 펩타이드는 세포막 단백질의 양 말단에

결합될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 **"바이오핀, biopin"**은 생물학적 물질, 예를 들어, 세포를 고정하기 위한 **융합 단백질을 말한다**. 특히, 상기 바이오핀에 사용되는 두 가지 요소는 **포유동물 세포의 특정 막단백질과 세포 침투 펩타이드**로 이루어져 있고, 세포의 특정 **막단백질이 머리부분을, 상기 막단백질의 양 말단에 결합된 세포 침투 펩타이드는 각각 끝부분을 형성하는 핀 구조를 이루는 것이다**. 보다 구체적으로, 세포의 특정 막단백질을 가운데 위치시키고, 이것의 세포 안쪽 부위(intracellular site)와 세포바깥쪽 부위(extracellular site) 양쪽에 세포 침투 펩타이드가 융합(fusion) 되도록 하여 제작된 융합 단백질을 바이오핀으로 명명하였다. 상기 바이오핀을 세포에 전달하면 세포막에 위치하여 세포 안쪽 부위에 **융합된 세포 침투 펩타이드는 세포 안쪽을 향하게 되고 바깥쪽 부위에 융합된 세포 침투 펩타이드는 세포 외부로 노출되어 대상 세포 또는 조직에 꽂히게 된다**(도 1, 첫 번째 그림 참조). 외부로 노출된 핀이 대상 세포 또는 조직에 꽂혀 세포간 결합이 증가되는 것은 막단백질 세포 안쪽 도메인에만 세포 침투 펩타이드가 융합된 형태의 융합 단백질을 세포에 전달하면 세포막에 위치하게 되지만 세포 외부로 노출된 세포 침투 펩타이드가 없어 대상 세포 또는 조직에 꽂히지 않음을 통해 입증된다(도 1, 두 번째 그림 참조).



도 1

[0035] 상기 세포막 단백질은 포유동물 세포의 막단백질이라면 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는, **트랜스멤브레인 도메인**이 좋다. 예를 들어, 오피오이드 수용체 델타의 트랜스멤브레인 도메인 1{opioid receptor delta transmembrane domain 1(OPRD TM1)} 등을 포함한 세포 사멸 등에 영향을 주지 않는 세포막 단백질이라면 특별히 제한하지 않는다.

[0036] 상기 세포 침투 펩타이드(cell-penetrating peptide(CPP) 또는 단백질 전달체{Protein Transduction Domain(PTD)}는 이들과 화학적, 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결된 특정 단백질, 바이러스, DNA, RNA, 지방, 탄수화물 또는 화학적 화합물을 진핵 또는 원핵 세포의 세포질 또는 핵내로 전달가능한 물질 펩타이드를 말한다.

[0037] 상기 세포 침투 펩타이드는 특별히 제한하는 것은 아니나, 인간 면역결핍 바이러스 타입 I(HIV-1)에서 유래한 trans-activating transcriptional activator(Tat) 단백질, 초파리의 안테나 페디아 호메오도메인(Antennapedia Homeodomain)인 Antp(Antennapedia 또는 penetratin) 펩타이드, 쥐의 전사인자의 Mph-1, HSV-1의 VP22 및 청어 프로타민의 HP4를 사용할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 세포 침투 펩타이드는 특정 세포 타입 또는 상태에 특이성을 갖는 세포-특이적 PTD를 포함할 수 있다. 이러한 세포-특이적 PTD의 한 예는 미국 특허공개 제 2002-0102265호에 기재된 Hn1 합성 펩타이드이다.

[0039] 또한, 상기 세포 침투 펩타이드는 합성 펩타이드일 수 있다. 이러한 합성 펩타이드의 한 예는 Ho 등이 HIV의 Tat 단백질이 단백질 전달 능력을 최적화하도록 Tat 단백질의 47-57 잔기를 변형한 펩타이드이다(Ho et al. (2001) Cancer Res 61(2):474-7).

[0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 세포 침투 펩타이드는 HIV의 Tat: YGRKKRRQRRR(서열 번호 2)를 포함하고 있다.

[0041] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 융합 단백질은 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 양 말단에 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열이 결합되어 있는 형태일 수 있다.

[0042] 본 발명의 융합 단백질은 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.

[0043] 따라서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0044] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0054] 본 발명은 또한 본 발명의 융합 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체를 제공한다.

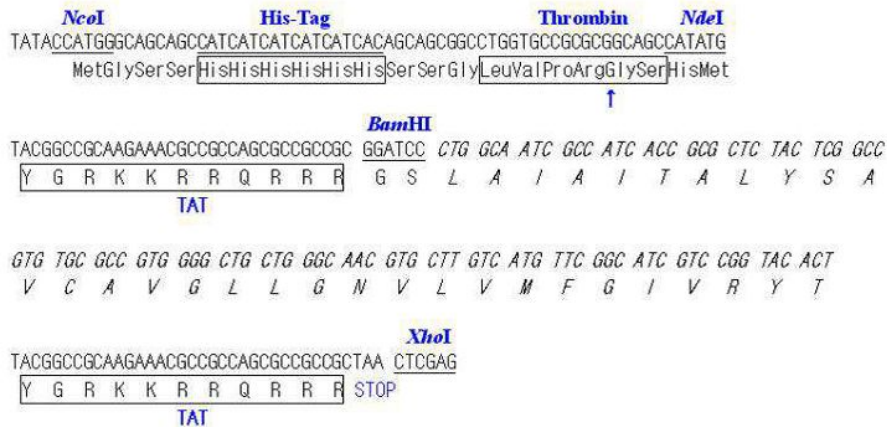
[0055] 상기 다클론성 항체의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 제조하는 것이 바람직하다.

[0056] 본 발명의 융합 단백질을 SPF(specific pathogen free)동물에 1 내지 수회 주사하여 면역화시킨다. 최종 면역 후 일정 시간이 지난 뒤에 전혈하여 혈청만 취해 본 발명의 단백질에 대한 다클론성 항체를 얻는다.

[0057] 상기 면역화 동물은 통상 면역화에 사용되는 동물이면 특별히 제한하지 않으나, 랫트인 것이 바람직하다. 상기 면역화를 위한 주사 횟수, 기간 및 투여방법은 당업자 수준에서 변형 또는 변경가능하므로 특별히 제한하지 않는다.

#### **[0114] <실시예 1> 재조합 방법에 따른 융합 단백질(바이오핀)의 제조**

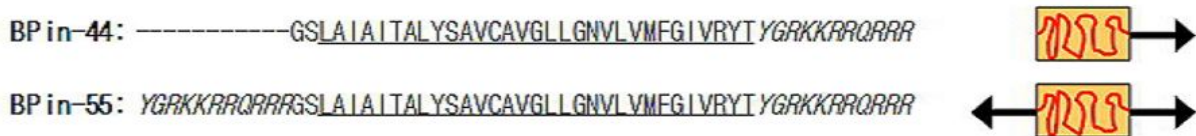
[0115] pHis/TAT 발현 벡터(Kwon JH et al., 2007, Biochem Biophys Res Commun., 363, 399-404)를 이용하여 제조하였다. OPRD cDNA를 주형으로 하여 두 가지 프라이머, Primer-1, 5'-TCACGTGGATCCCTGGCAATCGCCATCACCGCG-3'(밀줄 BamHI 부위) 및 Primer-2, 5'-AGGCATCTC GAGTTAGCGGCGGCGCTGGCGGCGTTTCTTGCGGCCGTAAGTGTAACCGGACGATGCCGAA-3'(밀줄 XhoI 부위)를 이용하여 PCR 하여 DNA 단편을 얻고, 각각의 제한효소(BamHI/XhoI)로 잘라 pHis/TAT 발현 벡터에 넣어 대장균주 BL21(DE3)에서 발현한 후 Ni-NTA affinity chromatography를 사용하여 단백질을 분리정제하였다. 이렇게 되면 372개의 아미노산으로 7개 트랜스멤브레인 도메인으로 구성된 OPRD 단백질의 첫 번째 도메인 부분인 48번째 아미노산(루신, L)부터 78번째 아미노산(트레오닌, T)까지 31개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 중심으로 N-말단과 C-말단에 각각 TAT 세포 침투 펩타이드가 융합된 바이오핀이 제조되었다(도 2 참조). 이때 대조군으로 31 아미노산으로 구성된 OPRD 펩타이드 한쪽에만 세포 침투 펩타이드가 위치하도록 제조하기 위해 Primer-1을 5'-TCGTCCCATATGGGATCCCTGGCAATCGCC ATCACCG-3'(밀줄 NdeI 부위)로 대신하여 PCR하여 같은 방법으로 제조하였다.



도 2

**[0116] <실시예 2> 펩타이드 합성을 통한 융합 단백질(바이오핀)의 제조**

[0117] 본 발명의 융합 단백질은 펩타이드 합성기(peptide synthesizer)를 이용하여 제조할 수 있다. 도 3은 Bio-Synthesis 사(USA)에 의뢰하여 펩타이드 합성기로 합성된 것으로 OPRD 첫 번째 도메인 양쪽에 세포 침투 펩타이드가 융합된 바이오핀(BPin-55)과 한쪽에만 융합된 BPin-44를 제조한 서열을 나타낸 것이다.



도 3

**[0118] <실시예 3> 형광물질로 표지한 바이오핀의 세포로의 전달**

[0119] 랫트의 심장 근아세포(Rat cardiac myoblast H9c2(3×10<sup>4</sup> cells) 세포를 4-웰 챔버(Lab-Tek chamber slide, Nunc, USA)에서 10% FCS와 항생제가 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. 세포를 24 시간 동안 안정화를 시킨 후 세포 표지용 염료(Vybrant™ Dil, Invitrogen, USA)를 최종 5 μl/mL의 농도로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 30분간 방치하였다. 이후 phosphate-buffered saline(PBS)로 3회 세척하여 준비하였다.

[0120] 두 종류의 바이오핀(BPin-44, BPin-55, 도 3 참조)은 Bio-Synthesis 사(USA)에 의뢰하여 합성하였다. 바이오핀의 표지화는 다음과 같이 시행하였다. 바이오핀 펩타이드(BPin-44,

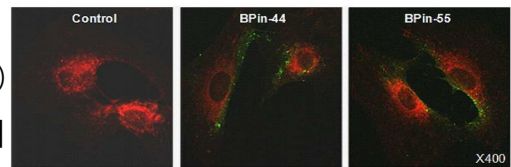
BPIn-55) 0.1 mg에 Dylight 488 NHE-ester dye(Thermo, USA)를 각각 20.6  $\mu\text{l}$ , 15.6  $\mu\text{l}$  처리하였다. 실온에서 1 시간 반응시킨 후 투석(Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units, Thermo, USA)을 실시하여 표지되지 않는 형광염료는 제거하였다.

[0121] 위의 준비된 세포에 **Dylight 488 NHE-ester dye**로 표지화된 바이오핀을 최종 1  $\mu\text{M}$  농도로 처리한 후 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 동안 방치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 공초점 현미경(Confocal Microscopy)에서 관찰하기 위해 세포 챔버에 mounting solution(3 drops) 처리한 후 LSM700 공초점 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 Vybrant™ Dil(적색) (Abs 549 nm/Em 565 nm), **Dylight 488 NHE-ester(녹색) (Abs 493 nm/Em 518 nm)**파장으로 관찰하였다.

[0122] **도 4에 나타난 바와 같이, 두 종류의 바이오핀 모두 세포막에 위치하는 것을 확인하였다.**

**<실시예 4> 바이오핀에 의한 세포간 결합 증가 효과**

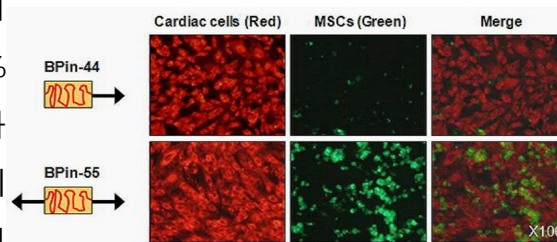
랫트의 심장 근아세포(Rat cardiac myoblast H9c2 세포)를 4-웰 챔버(Lab-Tek chamber slide)에 100% 차도록 배양하였다. 세포-표지화 염료(Vybrant™ Dil)를 최종 5  $\mu\text{l}$



도 4

/mL의 농도로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 30 분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하여 준비하였다. 랫트의 중간엽 줄기세포는 MesenPRO(Gibco, USA) 배지로 배양 접시에서 배양한 후 trypsin-EDTA와 trypsin-neutralizing solution을 1:1 비율로 넣어 5분간 처리하여 세포를 떼어내서 세포-표지화 염료(Vybrant™ DiO, Invitrogen, USA)로 최종 5  $\mu\text{l}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 30 분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 1,200 rpm으로 3분간 원심 분리하여 준비하였다.

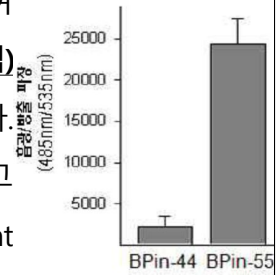
[0125] 여기에 위의 실시예 1 또는 2에서 준비된 융합 단백질을 최종 1  $\mu\text{M}$  농도로 처리한 후 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 동안 좌우로 흔들면서 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 원심분리하여 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 400  $\mu\text{l}$  처리하여 재현탁하였다. 이를 Vybrant™ Dil로 염색된 H9c2 세포 위에 뿌리고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 10 분간 방치하였다. 이후 PBS로 여러 번 세척하여 H9c2에 붙지 않은 MSCs



도 5



를 제거하고 형광현미경 IX71 형광현미경(Olympus, USA)을 사용하여 **Vybrant™ Dil(적색) (Abs 549 nm/Em 565 nm), Vybrant™ DiO(녹색) (Abs 488nm/Em 501 nm) 파장으로 각각 H9c2 세포와 MSCs를 관찰하였다.** H9c2에 부착되어 있는 MSCs를 정량화하기 위해 세포 배지를 걷어내고 0.1% Triton X-100을 200  $\mu\text{l}$  첨가한 후 5 분 후 걷어내 Fluorescent Spectrometer Victor3(Perkin-Elmer, USA)를 사용해 485/535 nm 파장에서 측정하였다.



도 6

[0126] 도 5 및 6에 나타난 바와 같이, 바이오핀 BPin-55가 전달된 실험군에서 **세포간 결합이 현저히 증가되는 것을 확인하였다.**

- 끝 -